

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 2 日 (02.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/049858 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/26, 1/37, G01N 33/72

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017196

(22) 国際出願日: 2004 年 11 月 18 日 (18.11.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-389930  
2003 年 11 月 19 日 (19.11.2003) JP

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷口 由利子 (TANIGUCHI, Yuriko) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目 3 番 1 号 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内 Ibaraki (JP). 齋藤 和典 (SAITO, Kazunori) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目 3 番 1 号 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内 Ibaraki (JP).

(54) Title: METHOD OF DETERMINING SUBSTRATE CONTAINED IN HEMOGLOBIN-CONTAINING SAMPLE

(54) 発明の名称: ヘモグロビン含有試料中の基質の測定方法

(57) Abstract: A simple and efficient method of determining a substrate contained in a sample, the method being reduced in interference with the hemoglobin contained in the sample and being applicable to various automatic analytical apparatuses; and a reagent for the determination. The method, which is for determining a substrate contained in a hemoglobin-containing sample, comprises causing an oxidase corresponding to the substrate to act thereon and optically measuring the amount of the resultant hydrogen peroxide with the aid of a peroxidase and an oxidizable color-assuming reagent and is characterized by treating the hemoglobin-containing sample with an anionic surfactant selected among polyoxyethylene alkyl ether sulfuric acid salts, polyoxyethylene alkyl phenyl ether sulfuric acid salts, polyoxyethylene alkyl ether phosphoric acids, polyoxyethylene alkylsulfosuccinic acids, polyoxyethylene alkyl ethercarboxylic acid salts, polyoxyethylene alkyl ethersulfonic acid salts, laurylsulfuric acid triethanolamine, alkylsulfosuccinic acids, and alkyl phenyl ethersulfonic acid salts.

(57) 要約: 試料中のヘモグロビンの干渉を軽減して種々の自動分析装置に適用できる簡便で効率の良い、試料中の基質を測定する方法及びその測定試薬を提供する。基質に対応するオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素をパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を用いて光学的に測定することにより試料中の基質を測定する方法において、ヘモグロビン含有試料をポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤で処理することを特徴とする、ヘモグロビン含有試料中の基質の測定。

WO 2005/049858 A1

## 明 細 書

### ヘモグロビン含有試料中の基質の測定方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、酵素反応を利用して試料中の基質を測定する方法において、試料中に共存するヘモグロビンによる測定系への干渉を軽減し、試料中の基質を精度よく測定する方法及びその測定用試薬に関する。

#### 背景技術

- [0002] 血液、尿などの生体試料中に存在する特定成分の測定は、その存在量の変動と疾病との関連が解明されるに従い、疾患の診断、病態の解明、治療効果の判断などを行う上で必須なものとなっている。現在、生体試料(例えば血清)中の特定成分の測定方法としては、目的とする特定成分もしくは当該特定成分由来の成分(以下、総称して「基質」ということがある)に特異的に反応する酵素を用いて酵素反応を行い、その結果生じる生成物を測定することにより定量する酵素法が一般的である。これら酵素法のなかでも、オキシダーゼのような過酸化水素生成酵素(以下、「オキシダーゼ酵素」ということがある)を基質に作用させ、生成する過酸化水素をパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を用いて発色系に導き、その呈色を比色定量する方法が広く普及している。
- [0003] 前記オキシダーゼ酵素を利用する基質の測定方法における基質としては、例えば、グルコース、コレステロール、中性脂肪、リン脂質、遊離脂肪酸、尿酸、クレアチニン、シアル酸、ポリアミン、糖化ヘモグロビンなどを挙げることができ、臨床検査の領域で実際に測定されている。
- [0004] しかしながら、当該測定方法は、オキシダーゼ酵素による酸化反応を基礎原理として成り立っているため、試料中に共存するアスコルビン酸、ビリルビン、ヘモグロビン等の生体内還元物質による干渉を受けやすく、測定値に負の誤差を生じるという問題がある。また、ビリルビンやヘモグロビンは、それ自身が可視領域に吸収を有するため、比色定量時の測定波長と重なり誤差の原因となることや、ビリルビンやヘモグロビン自身の吸光が外部からの光あるいは測定試薬中の成分によって経時的に変化

し測定結果に影響を与えることも知られている。前述のほか、脂質等による濁りの干渉を受けやすいことも知られている。

[0005] 上記した物質のうち、ヘモグロビンの生体試料(血清、血漿、尿、唾液、髄液等)への混入は、通常、極微量であるが、溶血をとまなう疾患などの場合のほか、採血など測定用試料の採取条件、血液試料の調製、保存条件によっては二次的に試料中に漏出することがある。また、全血や血球、或いはこれら进行处理して得た溶血液を試料とする場合には、自ずとヘモグロビンが混入する。従って、オキシダーゼ酵素を利用する基質の測定方法においてヘモグロビンの干渉を軽減させることは重要な課題となっている。

[0006] 試料中の基質をオキシダーゼ酵素を用いて定量する際のヘモグロビンの干渉を軽減する方法としては、ヘモグロビン自身の吸収波長を避けた特定波長で測定する方法(例えば、特許文献1参照)、陽イオン系又は両性界面活性剤を用いる方法(例えば、特許文献2参照)が知られている。

[0007] しかしながら、ヘモグロビン自身の吸収波長を避けて特定の検出波長で測定する方法では、比色定量時の検出波長が限定されるとともに、測定装置も限定される。また、陽イオン系又は両性界面活性剤を用いる方法では、試料と混和した際に濁りを生じたり、酵素活性に影響を与える場合がある。

[0008] 上記の他に、2種類の陰イオン系界面活性剤を組み合わせる方法も知られている(特許文献3参照)が、この方法では、陰イオン系界面活性剤による酵素蛋白質の変性を回避するために、特定量のアルキルスルホン酸塩及びアルキルナフタレンスルホン酸塩を同時に使用する必要があった。

特許文献1:特開平9-119932号公報

特許文献2:特開平3-10696号公報

特許文献3:特開平8-89288号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、酵素反応を利用して試料中の基質を測定する方法において、試料中に共存するヘモグロビンの測定系への干渉を軽減して種々の自動分析装置に適用で

きる簡便で効率の良い、試料中の基質を測定する方法及びその測定用試薬を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、かかる実情に鑑み、酵素反応を利用して試料中の基質を測定する方法において、試料中に共存するヘモグロビンの測定系への干渉を軽減する方法について鋭意検討した結果、試料を特定の陰イオン系界面活性剤で処理することにより測定系へのヘモグロビンの干渉を軽減できることを見出し、本発明を完成した。
- [0011] すなわち、本発明は、基質に対応するオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素をパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を用いて光学的に測定することにより試料中の基質を測定する方法において、ヘモグロビン含有試料をポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤で処理することを特徴とする、ヘモグロビン含有試料中の基質の測定方法を提供するものである。
- [0012] 本発明はまた、(A)ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤、(B)基質に作用して過酸化水素を生成するオキシダーゼ、並びに(C)パーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を含むヘモグロビン含有試料中の基質測定用試薬を提供するものである。
- [0013] 本発明はまた、少なくとも、(1)界面活性剤、(2)糖化蛋白質に作用してフルクトシルペプチドを生成する蛋白質分解酵素及び(3)フルクトシルペプチドに作用して過酸化水素を産する酵素を含むことを特徴とする糖化蛋白質、糖化ペプチドもしくは糖

化アミノ酸の濃度又はそれらの濃度比測定方法を提供するものである。

[0014] 本発明はまた、少なくとも界面活性剤で前処理されたヘモグロビンを含む試料中のヘモグロビン測定を行い、更にヘモグロビン測定用反応液にフルクトシルバリルヒスチジンを生成する蛋白質分解酵素を作用させ、ヘモグロビンA1c濃度測定を行うことを特徴とするヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定方法を提供するものである。

[0015] 本発明はまた、血球を含む試料と界面活性剤を含む反応液を混合して血球からヘモグロビンを溶出させる工程、本反応液を希釈して光学的にヘモグロビンの濃度を求める工程、ヘモグロビンに蛋白質分解酵素を作用させて少なくともフルクトシルバリルヒスチジンを産する工程、少なくともフルクトシルバリルヒスチジンにこれを基質として過酸化水素を産する酵素を作用させる工程、過酸化水素とパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を作用させる工程、呈色化合物の生成による吸光度変化を測定しヘモグロビンA1c濃度を求める工程、並びにヘモグロビン濃度とヘモグロビンA1c濃度からヘモグロビンA1c濃度比を求める工程からなるヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定方法を提供するものである。

[0016] 本発明はまた、ポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれる非イオン系界面活性剤及び／又は陰イオン系界面活性剤を用いることを特徴とするヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定における試料の前処理方法を提供するものである。

[0017] 本発明はまた、血球からヘモグロビンを溶出させる工程、ヘモグロビンの濃度を求める工程からなるヘモグロビン濃度測定において、少なくともポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれる非イオン性界面活性剤及び／又は陰イオン系界面活性剤を用いることを特徴とするヘモグロビン濃度測定方法を提供するものである。

[0018] 本発明は更に、生化学自動分析装置を用いてヘモグロビンA1c濃度比を測定する

目的で、生化学自動分析装置の操作条件を設定する際に、(1)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の操作条件を個別に設定する、(2)ヘモグロビン濃度測定試薬をヘモグロビンA1c濃度測定用の構成試薬として共用できる、(3)ヘモグロビン濃度測定用とヘモグロビンA1c濃度測定用の試料を共用できる、(4)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の測定波長を同一にできることを特徴とする、生化学自動分析装置を用いてヘモグロビンA1c濃度比を測定する方法を提供するものである。

### 発明の効果

- [0019] 本発明の基質の測定方法によれば、試料中に共存するヘモグロビンの干渉を軽減して、基質を精度よく測定することができる。また、本発明の基質の測定方法は、簡便な操作で測定が可能であるため、種々の分析方法に適用でき、臨床検査の領域において極めて有用である。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0020] 本発明の基質の測定方法は、試料中に共存するヘモグロビンの干渉を軽減する目的で、試料を特定の陰イオン系界面活性剤で処理する以外は、公知の酵素法に準じて実施することができる。
- [0021] 本発明が適用可能な試料としては、ヘモグロビンを含む試料であれば特に制限はない。生体試料としては、全血、血球、血清、血漿、髄液、汗、尿、涙液、唾液、皮膚、粘膜、毛髪等が挙げられる。このうち、全血、血球、血清又は血漿が好ましい。これらの試料は、そのまま測定に供することはもちろん、ろ過や透析処理の後に測定に供してもよく、また必要であれば、試料(基質)を濃縮、抽出、希釈等してもよい。
- [0022] 前記した希釈は、水又は緩衝液で行うことができる。この場合の緩衝液の種類、濃度に特に制限はなく、リン酸、フタル酸、クエン酸、トリス、マレイン酸、コハク酸、シュウ酸、酒石酸、酢酸、グッド(MES、PIPES、ADAなど)の緩衝液等を0.00001〜2 mol/L、好ましくは0.001〜1 mol/Lの濃度で 사용할 ことができる。
- [0023] 本発明の基質の測定方法に使用できる特定の陰イオン系界面活性剤は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアル

キルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤であり、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類又はアルキルスルホコハク酸類であり、特に好ましくはポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩又はアルキルスルホコハク酸類であり、最も好ましくはポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸である。これら特定の陰イオン系界面活性剤は、市販品として入手可能である。

[0024] ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類としては、例えば、ニッコールSBL-4N、ニッコールSBL-2T-36(以上、日本油脂社製)、エマール20T、エマール327、エマール20C(以上、花王社製)、ハイテノール225L、ハイテノール325D、ハイテノールNF13、ハイテノールNF15(以上、第一工業製薬社製)、サンノールLMT-1430、サンノールDM1470(以上、ライオン社製)などが挙げられる。ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類としては、例えば、ニッコールSNP-4N(日本油脂社製)、エマールNC35(花王社製)などが挙げられる。ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類は、リン酸モノエステル、リン酸ジエステル又はその混合物でもよく、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類としては、例えば、プライサーフA208B、プライサーフA219B、プライサーフA208S、プライサーフA212C、プライサーフA212E、プライサーフA215C(以上、第一工業製薬社製)などが挙げられる。これらのポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸のうちで、プライサーフA208Bが好ましい。ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類としては、例えば、ネオハイテノールS-70、ネオハイテノールL-30、ネオハイテノールLM-20(以上、第一工業製薬社製)などが挙げられる。ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類としては、例えば、カオーアキボRLM-100NV(花王社製)、ネオハイテノールECL-30(第一工業製薬社製)、エヌジェコブ2PS30、エヌジェコブ2PS45(以上、新日本理化社製)などが挙げられる。ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホ

ン酸類としては、例えば、リオノールOAI-N、リオノールOBI(以上、ライオン社製)などが挙げられる。

[0025] ラウリル硫酸トリエタノールアミンとしては、例えば、エマールTD(花王社製)が挙げられる。アルキルスルホコハク酸類としては、例えば、ペレックスCS(花王社製)が挙げられる。アルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類としては、例えば、ペレックスSS-H(花王社製)が挙げられる。

[0026] ヘモグロビン含有試料の処理は、当該特定の陰イオン系界面活性剤と試料を混合することにより行うことができる。特定の陰イオン系界面活性剤の使用量は、前記した全血、血球、血清などの試料と混合した後の濃度として、0.0001〜10%、好ましくは0.001〜3%である。ヘモグロビン含有試料の処理の時間、処理の温度は特に制限されず、例えば、自動分析装置へ適用する場合、処理時間5分、処理温度37℃などが好ましい。また自動分析装置に適用する前に別途処理をすることもできる。これら処理の条件はいずれも実験によって適宜選択することができる。同様に特定の陰イオン系界面活性剤により試料を処理する際のpHや添加物等も、酵素反応を利用して基質を測定する際の障害とならない範囲で制限がない。

[0027] 本発明の基質の測定方法で測定可能な基質は、オキシダーゼを用いる酵素法で測定できるものであれば制限されない。従って、本発明における「基質」には、それ自体がオキシダーゼの基質になりうる物質である場合、及び酵素反応や何らかの処理により生成した生成物がオキシダーゼの基質になりうる場合(前述した特定成分由来の成分に相当)が含まれる。これらの基質として、グルコース、マンノース、ガラクトース等の糖類;コレステロール、中性脂肪、リン脂質、遊離脂肪酸等の脂質類;糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン等の糖化蛋白質類;尿酸、尿素、クレアチニン、シアル酸、ポリアミンなどを例示することができる。

[0028] これらのうち、グルコース、尿酸などが、それ自体がオキシダーゼの基質となりうる物質である場合に該当し、血清中のエステル型コレステロールを加水分解酵素で処理して得られるコレステロールや血清中の糖化蛋白質を蛋白質分解酵素で処理して得られる糖化ペプチド及び糖化アミノ酸などが、酵素反応や何らかの処理により生成した生成物がオキシダーゼの基質になりうる場合に該当する。



- [0029] 酵素反応や何らかの処理により生成した生成物がオキシダーゼの基質になりうる場合のうち、糖化蛋白質を蛋白質分解酵素で処理してオキシダーゼの基質となる糖化ペプチド及び糖化アミノ酸を得ようとする場合を例にさらに説明する。
- [0030] この場合の蛋白質分解酵素は、蛋白質分解活性、ペプチド分解活性を有していれば由来は微生物由来、動物由来、植物由来などの何れでもよく特に制限されない。短時間で効率よく目的とする糖化蛋白質(例えばヘモグロビンA1c)から糖化ペプチド又は糖化アミノ酸、好ましくはフルクトシルペプチド又はフルクトシルアミノ酸、特に好ましくはフルクトシルバリルヒスチジン又はフルクトシルバリンを遊離するものが使用される。具体的には、プロテイナーゼK、トリプシン、ブロメライン、カルボキシペプチダーゼ、パパイン、ペプシン、アミノペプチダーゼなど研究用試薬として広く市販されているものや、ニュートラルプロテイナーゼ、トヨチームNEP(以上、東洋紡社製)、酸性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、モルシン、AOプロテアーゼ、ペプチダーゼ(以上、キッコーマン社製)、スミチームCP、スミチームTP、スミチームLP50D(以上、新日本化学工業社製)、サモアーゼPC10F、プロチンPC、プロチンPC10F、プロチンPS10、プロチンNY10、プロチンNL10、プロチンNC25(以上、大和化成社製)、アクチナーゼAS(科研製薬社製)、プロナーゼE(ロシュ社製)、ウマミザイム、プロテアーゼS「アマノ」G、プロテアーゼA「アマノ」G、プロテアーゼP「アマノ」3G(以上、アマノエンザイム社製)など工業用として市販されているものが挙げられる。これら蛋白質分解酵素は、目的とする糖化蛋白質、フルクトシルペプチドと作用させ、作用の前後の試料をキャピラリー電気泳動を用いて分析、比較することにより効果を確認できる。上記蛋白質分解酵素は、単独で用いても、また二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらのなかで、バチルス属、アスペルギルス属もしくはストレプトマイシス属の微生物由来、あるいはその遺伝子により産生されるもの、又は、メタロプロテイナーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼもしくは塩基性プロテアーゼに属するものが好ましい。
- [0031] 蛋白質分解酵素の濃度は、目的とする基質を効率よく遊離できる濃度であれば特に制限はない。使用する酵素の比活性などを考慮し、実験的に使用濃度を適宜設定することができる。蛋白質分解酵素で処理するときのpHは、特に調整しなくてもよ

いが、使用する酵素の作用に好適なpHとなるように、適当なpH調整剤、例えば緩衝液によってpH3〜11に調整してもよい。処理温度は、10〜40℃が好ましい。

[0032] 本発明の基質の測定方法において使用できるオキシダーゼとしては、測定すべき基質を酸化して過酸化水素を生成する能力を有する酵素であり、公知のオキシダーゼを使用できる。例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカゼ、コレステロールオキシダーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(特開2003-79386号公報及び国際公開第97/20039号パンフレット)、ケトアミンオキシダーゼ(特開平5-19219号公報)、フルクトシルペプチドオキシダーゼ(特開2001-95598号公報及び特開2003-235585号公報)などを挙げることができる。これらの酵素は、微生物由来、動物由来、植物由来等のいずれでもよく、また遺伝子操作により作られたものでもよい。更に、化学修飾の有無も問わない。これらの酵素は、溶液状態でも乾燥状態でもよく、不溶性担体に保持又は結合されていてもよく、単独で又は2種以上を組み合わせ使用することができる。

[0033] これらの酵素の使用量は、酵素の種類によっても異なるが、使用する酵素の比活性などを考慮し、実験的に使用濃度を適宜設定することができ、特に制限はない。好ましくは0.001〜1000単位/mL、特に好ましくは0.01〜1000単位/mLである。作用させるときのpHは、使用する酵素の至適pHを考慮し、緩衝液を用いて調整する。作用温度は、例えば、10〜40℃であり、通常の酵素反応に用いられる温度を適宜選択できる。

[0034] 上記オキシダーゼは、必要に応じて、他の酵素、補酵素、被酸化性呈色試薬等と組み合わせ使用することができる。他の酵素としては、パーオキシダーゼ、ジアホラーゼ又はフルクトシルバリンを基質としないアミノ酸代謝酵素などが挙げられる。また、ヘモグロビン以外の生体内干渉物質を処理する目的で、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等の酵素も使用できる。補酵素としてはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型(NADH)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型リン酸(NADPH)、チオNAD、チオNADP等が挙げられる。

[0035] 被酸化性呈色試薬としては、過酸化水素と反応して呈色するものであれば如何な

るものでもよい。例えば、4-アミノアンチピリンと、フェノール系、ナフトール系又はアニリン系化合物との組み合わせ、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとアニリン系化合物との組み合わせなどが挙げられる。4-アミノアンチピリンと組み合わせることができるフェノール系化合物としては、フェノール、p-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノール、2, 4-ジブromフェノール、2, 4, 6-トリクロロフェノールなどが挙げられ、アニリン系化合物としては、N, N-ジメチルアニリン、N, N-ジエチルアニリン、N, N-ジメチル-m-トルイジン、N, N-ジエチル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、3-メチル-N-エチル-N-(ヒドロキシエチル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン(ALOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン(ALPS)、N, N-ジメチル-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン(ADOS)などが挙げられる。その他、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)-ジフェニルアミン・ナトリウム塩(DA-64)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-フェノチアジン・ナトリウム塩(DA-67)、10-N-メチルカルバモイル-3, 7-ジメチルアミノ-10H-フェノチアジン(MCDP)、N, N, N', N', N'', N''-ヘキサ-3-スルホプロピル-4, 4', 4''-トリアミノトリフェニルメタン(TPM-PS)、ジアミノベンチジン、ヒドロキシフェニルプロピオン酸、テトラメチルベンチジン、オルトフェニレンジアミンなどが挙げられる。

[0036] 本発明の基質の測定方法では、試料を前記陰イオン系界面活性剤で処理して試料中のヘモグロビンの干渉を軽減する工程とオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を測定する工程とを別々に行って基質を測定することもできるし、これらの工程を連続的に一段階で行って基質を測定することもできる。反応温度は、これら2つの工程で同一でも異なってもよく、本発明の基質測定用試薬が溶液状態にある温度、例えば、10-40℃が好ましい。

[0037] 本発明の基質の測定方法は、オキシダーゼ反応により基質を測定する際のヘモグロビンの干渉を軽減する一方で、本発明に係る陰イオン系界面活性剤で試料を処理

した段階でヘモグロビンの有する吸収波長域における吸光度を測定すれば試料中のヘモグロビンを測定することができる。これにより糖化ヘモグロビン(好ましくはヘモグロビンA1c)を測定することができるので、本発明の基質の測定方法によりヘモグロビンA1cを測定する場合について説明する。

[0038] ヘモグロビンA1cは、赤血球に含有されるヘモグロビンが非酵素的に糖化されて形成されたものであり、過去一定期間の平均血糖値を反映することから臨床検査における指標として重要視されている。ヘモグロビンA1cは総ヘモグロビン存在量に対する比率(%)で表示されることから、その測定には、(i)赤血球を溶血させてヘモグロビンを赤血球外に放出させ、測定可能な状態にする工程、(ii)ヘモグロビンの存在量を測定する工程、(iii)ヘモグロビンA1cの存在量を測定する工程(酵素法の場合、ヘモグロビンA1cから蛋白質分解酵素により特異的な糖化ペプチドあるいは糖化アミノ酸を遊離させる工程と当該遊離した糖化ペプチド又は糖化アミノ酸を特異的オキシダーゼを使用して測定する工程が含まれる)、(iv)ヘモグロビンA1cの存在量を総ヘモグロビンの存在量で除し比率を求める工程(演算工程)、が必要である。なお、ここで述べるように、本明細書において「基質の測定」の語は、試料中の基質の存在量(例えば濃度)の測定のほか、特定の基準物質に占める存在割合(例えば濃度比)の測定も含む。

[0039] 本発明に係る陰イオン系界面活性剤は、ヘモグロビンのメト化処理能も有しているため、ヘモグロビンの吸収波長域の吸光度を測定して(ii)の工程を問題なく実施できる。

[0040] (i)の工程には、従来公知の各種界面活性剤(例えば、非イオン系界面活性剤であるトリトンX-100など)が使用できるが、本発明に係る陰イオン系界面活性剤、特にポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、或いはラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類、アルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれる陰イオン系界面活性剤は、(i)の工程においても使用可能であり、単独もしくは従来公知の各種界面活性剤と併用しても差し支えない。また(i)の工程で単独もしくは本発明に係る陰イオン系界面活性剤と併用可能な非イオン系界面活性剤としては、従来公知のもののほかに、ポリオキシエチレン誘導体であるエ

マルゲン類(花王社製、エマルゲン709、エマルゲン108、エマルゲンA90、エマルゲンB66など)、ニッコール類(ニッコーケミカルズ社製、ニッコールBC20TX、ニッコールOP-10、ニッコールBT9など)、リポノックス類(ライオン社製、リポノックスNC80、リポノックスOC100など)レオコール類(ライオン社製、レオコールTD90、レオコールSC120など)ノイゲン類(第一工業製薬社製、ノイゲンEA120、ノイゲンET147など)、エパン類(第一工業製薬社製、エパン485、エパンU103など)、プルロニック類(旭電化社製、プルロニックF、プルロニックTR704など)、アデカトール類(旭電化社製、アデカトールSO120など)が使用できる。

[0041] (iii)の工程は、ヘモグロビンA1cに由来する糖化ペプチド又は糖化アミノ酸をヘモグロビンA1cから蛋白質分解酵素により遊離させ、さらにフルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを使用して実施できる。(iii)の工程について前述しているが、さらに詳細に説明する。ヘモグロビンA1cの測定では、ヘモグロビン $\beta$ -サブユニットのアミノ末端のバリンが糖化されたフルクトシルバリンやフルクトシルバリルヒスチジンと、 $\epsilon$ -フルクトシルリジンに対するオキシダーゼ酵素の反応性の違いが特異性を決定するが、ヘモグロビン分子中には44個のリジン残基が存在しており、 $\epsilon$ -フルクトシルリジンに対する反応性が低くとも、その影響を無視できない。またヘモグロビンの $\alpha$ 鎖N末端のバリンも糖化によりフルクトシルバリンとなるが、バリンと隣接して結合しているアミノ酸はヒスチジンではないのでフルクトシルバリルヒスチジンは生成しない。従って酵素法によるヘモグロビンA1c測定の特異性を確保するためには、フルクトシルリジンの測り込みを出来る限り排除することはもちろん、フルクトシルバリンだけを測定するよりもフルクトシルバリルヒスチジルペプチドを測定した方が有利となる。これより、蛋白質分解酵素がフルクトシルバリルヒスチジルペプチド、好ましくはフルクトシルバリルヒスチジンを遊離させるもので、フルクトシルペプチドオキシダーゼがフルクトシルバリルヒスチジンに作用するものが、特異性向上の観点から最も好ましい。

[0042] 上記のような蛋白質分解酵素として、前述したバチルス属、アスペルギルス属もしくはストレプトマイセス属の微生物由来、あるいはその遺伝子組み換えにより産生されるものが好適である。バチルス属由来の酵素としては、プロチンPC10F、プロチンN

C25(大和化成社製)、トヨチームNEP(東洋紡社製)など、アスペルギルス属由来の酵素としては、モルシン(キッコーマン社製)、ストレプトマシシス属由来の酵素としては、アクチナーゼAS、アクチナーゼAF、アクチナーゼE(科研製薬)、プロテアーゼType-XIV(シグマ社製)などが挙げられる。これらは単独で利用できるほか、トヨチームNEPなどはプロテイナーゼKと混合して併用することもできる。これら酵素は、メタロプロテイナーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼもしくは塩基性プロテアーゼに属するものが好ましい。使用濃度や使用条件は前述したとおりである。

[0043] 上記のようなフルクトシルペプチドオキシダーゼとしては、コリネバクテリウム属菌の産生するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを改変した酵素(特開2001-95598号公報)、糸状菌由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ(特開2003-235585号公報)などが挙げられる。FPOX-CE又はFPOX-EE(ともにキッコーマン社製)が特に好適である。

[0044] (i)の工程から(iv)の工程までを順次、実施しても良いが、複数の工程を同時に実施することもできる。例えば、トリトンX-100などの溶血を目的とした界面活性剤、プライサーフA208Bなどの本発明に係る陰イオン系界面活性剤をともに含む試薬で全血あるいは血球を処理すれば(i)、(ii)の工程を同時に実施することができ、さらにプロテイナーゼKやアクチナーゼASなどの蛋白質分解酵素を共存させれば、(iii)の工程の一部も同時に実施することができる。

[0045] またさらに、本発明のヘモグロビンA1cの測定方法によれば、日立7150形自動分析装置など臨床検査(特に生化学検査)の領域で汎用される自動分析装置(以下「生化学自動分析装置」ということがある)を用いてヘモグロビンA1c濃度比(%) (以下「ヘモグロビンA1c(%)」と言うことがある)を測定する場合において、生化学自動分析装置の操作条件を設定する際に、(1)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の操作条件を個別に設定する、(2)ヘモグロビン濃度測定用試薬をヘモグロビンA1c濃度測定用の構成試薬として共用できる、(3)ヘモグロビン濃度測定用とヘモグロビンA1c濃度測定用の試料を共用できる、(4)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の測定波長を同一にすることができる。これら(1)〜(4)を特徴とする、生化学自動分析装置を用いてヘモグロビンA1c値(%)を測定する方法も

提供される。

[0046] 本発明の試薬はヘモグロビンA1c濃度比を測定する際に、1つの反応容器を用いてヘモグロビン濃度とヘモグロビンA1c濃度を測定しても、また生化学自動分析装置を用いて測定する際に構成試薬の連続した添加を行ういわゆる1チャンネル法で使用してもよいが、生化学自動分析装置の操作条件を設定する際に、ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の試薬使用量など操作条件を個別に設定するのが好ましい。本発明の試薬はヘモグロビン濃度測定用試薬をヘモグロビンA1c濃度測定用の構成試薬として共用でき、試料も共用できる。測定条件のうち、ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の測定波長を同一にできる。

[0047] 本発明の基質測定用試薬は、(A)ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤、(B)基質に作用して、又は酵素反応により生成した基質に作用して過酸化水素を生成するオキシダーゼ、及び(C)パーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬、を含む。

[0048] 更に、前記(B)記載のオキシダーゼを作用させた結果生じる生成物からさらに過酸化水素を生成させ感度増加を図ることもできる。例えばヘモグロビンA1cから遊離した糖化ペプチド又は糖化アミノ酸とフルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが作用した際に生成するグルコソンに糖酸化分解酵素を含ませても良い(特開2000-333696号公報)。この場合の糖酸化分解酵素としては、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ピラノースオキシダーゼからなる群から選択された少なくとも一つの酸化酵素であることが好ましい。このほか、赤血球からヘモグロビンを取り出して反応に供するための前処理剤が使用できることは前述した。さらにまた、血液中の夾雑成分を処理する酵素、塩化ナトリウム、塩化カリウム、フェロシアン化カリウム等の塩、反応調整剤、還元性物質の影響回避のためのテトラゾリウム塩、防腐剤としての抗生物質、アジ化ナトリウム等も添加できる。

[0049] 本発明の基質測定用試薬は、溶液状態だけでなく、乾燥状態やゲル状態でも提供できる。また、ガラスビン、プラスチック容器等への充填の他、不溶性担体への塗布、含浸などの形態で提供できる。不溶性担体としては、例えば、ラテックス、ガラス、コロイドなどの粒子・球状担体、半導体やガラスなどの平板状担体、紙やニトロセルロースなどの膜状担体、繊維状担体が挙げられる。

## 実施例

[0050] 次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0051] [実施例1〜6] 尿酸の測定

### (1) 試料の調製

血清9容に対して生理食塩液又はヒトヘモグロビン液1容を加えて、ヘモグロビン濃度が0、100、300、及び500mg/dLのヘモグロビン含有試料を調製した。

[0052] (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、以下の操作により各試料の測定を行った。

### <第一試薬>

#### 陰イオン系界面活性剤

実施例1;0.5% エマール20C(花王社製)

実施例2;0.5% ハイテノールNF13(第一工業製薬社製)

実施例3;0.05% ハイテノールNF15(第一工業製薬社製)

実施例4;0.5% プライサーフA208B(第一工業製薬社製)

実施例5;0.05% ペレックスCS(花王社製)

実施例6;0.1% ペレックスSS-H(花王社製)

比較例1;陰イオン系界面活性剤を含まない

比較例2;0.05% ラテムルPS+0.05% ペレックスNBL

比較例3;0.1% ラテムルPS+0.1% ペレックスNBL

500  $\mu$ mol/L TOOS(同仁化学社製)

50mmol/L リン酸緩衝液(pH7.0)

(陰イオン系界面活性剤を組み合わせるヘモグロビンの干渉を回避する従来公知(



特開平8-89288)の方法に記載されたアルキルスルホン酸ナトリウム塩(商品名ラテムルPS:花王社製)及びアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩(商品名ペレックスNB-L:花王社製)の組み合わせを比較例2、3とした。)

<第二試薬>

2単位/mL ウリカーゼ(東洋紡社製)

10単位/mL パーオキシダーゼ(III)(東洋紡社製)

1mmol/L 4-アミノアンチピリン

50mmol/L リン酸緩衝液(pH7.0)

[0053] 各試料7 $\mu$ Lに第一試薬260 $\mu$ Lを加え、37℃で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度I)。次いで第二試薬130 $\mu$ Lを加え、37℃で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度II)。吸光度の測定は主波長546nm(副波長800nm)で行い、試料の代わりに生理食塩水を用いて同様に操作したもの(試薬ブランク)を対照とした。各試料の吸光度I及び吸光度IIから式Aを用いて各試料の吸光度変化量を算出し、濃度既知の尿酸溶液(20mg/dL)を試料として上記と同様に操作した場合の吸光度変化量と比較し尿酸濃度を算出した。

式A: 試料の吸光度 = 吸光度II - (吸光度I  $\times$  (7 + 260) / (7 + 260 + 130))

得られた尿酸の測定値について、ヘモグロビン濃度0mg/dLの場合の測定値を100%として比較した。結果を表1に示した。

[0054] [表1]

	陰イオン系界面活性剤	ヘモグロビン濃度 (mg/dL)			
		0	100	300	500
比較例1	無添加	100.0	92.1	74.8	77.2
比較例2	0.05% ラテムルPS + 0.05% ペレックスNB-L	100.0	83.6	62.1	54.3
比較例3	0.1% ラテムルPS + 0.1% ペレックスNB-L	100.0	82.4	72.6	74.0
実施例1	0.5% エマール20C	100.0	95.0	89.0	85.3
実施例2	0.5% ハイテノールNF13	100.0	93.9	87.9	84.6
実施例3	0.05% ハイテノールNF15	100.0	89.8	86.6	83.6
実施例4	0.5% プライサーフA208B	100.0	95.5	94.4	86.4
実施例5	0.05% ペレックスCS	100.0	92.9	88.9	88.7
実施例6	0.1% ペレックスSS-H	100.0	97.2	80.5	78.7
		(%)	(%)	(%)	(%)

[0055] 表1から明らかなように、従来公知の陰イオン系界面活性剤の組み合わせ(比較例2及び3)では、界面活性剤無添加の比較例1に比べて、むしろヘモグロビンの干渉が増大した。これに対し、本発明に係る陰イオン系界面活性剤を使用した場合には(実施例1〜6)、何れも界面活性剤無添加の比較例1に比べてヘモグロビンの干渉が軽減されていた。これより、本発明の基質の測定方法は、従来公知の方法が有効でない場合でも、有効であることがわかった。

[0056] [実施例7] フルクトシルアミノ酸の測定

(1) 試料の調製

542nmにおける吸光度が5 ODとなるように調製したヘモグロビン-生理食塩水希釈液を用い、フルクトシルバリン(IV)濃度が $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ のヘモグロビン含有試料を調製した。コントロールとして、ヘモグロビン-生理食塩水希釈液に代えて生理食塩水を用いた。IVはバイオクエスト社製を使用した。

[0057] (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用い、以下の操作により各試料の測定を行った。

<第一試薬>

陰イオン系界面活性剤

実施例7; 0.2% プライサーフA208B(第一工業製薬社製)

比較例4; 陰イオン系界面活性剤を含まない

$20\text{mmol/L}$  リン酸緩衝液(pH8.0)

<第二試薬>

$15\text{単位/mL}$  フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(キッコーマン社製)

$20\text{単位/mL}$  パーオキシダーゼ(III)(東洋紡社製)

$80 \mu\text{mol/L}$  TPM-PS(同仁化学社製)

$200\text{mmol/L}$  リン酸緩衝液(pH7.0)

[0058] 各試料 $20 \mu\text{L}$ に第一試薬 $240 \mu\text{L}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度I)。次いで第二試薬 $80 \mu\text{L}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度II)。吸光度の測定及び試料の吸光度変化量の算出は、実施例1〜6に準じた。結果を表2に示した。

[0059] [表2]

f V 濃度		a	b	b / a
5	実施例 7	7 1	6 7	9 4
	比較例 4	6 0	5 1	8 5
1 0	実施例 7	1 1 8	1 1 0	9 3
	比較例 4	1 0 3	8 5	8 3

 $(\mu\text{mol/L})$  $(\text{mOD/mL})$  $(\text{mOD/mL})$  $(\%)$ 

a : コントロールの吸光度変化量、b : ヘモグロビン含有試料の吸光度変化量

[0060] 表2から明らかなように、本発明に係る陰イオン系界面活性剤を使用した場合には、ヘモグロビンの干渉が軽減されていた。

[0061] [実施例8] フルクトシルアミノ酸の測定

(1) 試料の調製

実施例7と同様にしてヘモグロビン含有試料及びコントロールを調製した。

[0062] (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、第二試薬を以下とする以外は、実施例7と同様の操作により各試料の測定を行った。

&lt;第二試薬&gt;

4単位/mL フルクトシルペプチドオキシダーゼ(キッコーマン社製)

20単位/mL パーオキシダーゼ(III)(東洋紡社製)

80  $\mu\text{mol/L}$  TPM-PS(同仁化学社製)

200mmol/L リン酸緩衝液(pH5. 5)

[0063] [表3]

f V 濃度		a	b	b / a
5	実施例 8	4 4	4 3	9 8
	比較例 5	4 3	2 6	6 0
1 0	実施例 8	8 4	7 8	9 3
	比較例 5	8 3	5 0	6 0

 $(\mu\text{mol/L})$  $(\text{mOD/mL})$  $(\text{mOD/mL})$  $(\%)$ 

a : コントロールの吸光度変化量、b : ヘモグロビン含有試料の吸光度変化量

[0064] 表3から明らかなように、本発明に係る陰イオン系界面活性剤を使用した場合には

、ヘモグロビンの干渉が軽減されていた。

[0065] [実施例9～13] ヘモグロビンA1cの測定

(1) 試料の調製

EDTAを抗凝固剤として含む採血管を用いて被検者10人から常法により採血した全血を、冷室に一晚静置して赤血球を沈降させた。沈降した各赤血球層より10  $\mu$  Lを分取し、これに0.1% トリトンX-100水溶液 300  $\mu$  Lを添加混合し、血球溶血試料を調製した。

[0066] (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、以下の操作により各試料の測定を行った。

< 第一試薬 >

陰イオン系界面活性剤

実施例9;0.5% プライサーフA212E(第一工業製薬社製)

実施例10;0.5% プライサーフA215C(第一工業製薬社製)

実施例11;0.2% プライサーフA208B(第一工業製薬社製)

実施例12;0.5% ニッコールSBL-4N(日本油脂社製)

実施例13;3.0% エマールNC35(花王社製)

比較例6;陰イオン系界面活性剤を含まない

1単位/mL プロテインナーゼK

0.02mol/L リン酸緩衝液(pH8.0)

< 第二試薬 >

4単位/mL フルクトシルペプチドオキシダーゼ(FPOX-CE、キッコーマン社製)

20単位/mL パーオキシダーゼ(III)(東洋紡社製)

80  $\mu$  mol/L TPM-PS(同仁化学社製)

7500単位/mLトヨチームNEP(東洋紡社製) \*

37.5mmol/L NaCl

0.2mol/L リン酸緩衝液(pH5.5)

\*トヨチームNEPは、10万単位/mLの濃厚液を500mmol/LのNaClを含む20mmol/Lのリン酸緩衝液(pH5.5)に対し、4℃で4時間透析した後使用した。

[0067] 各試料20 $\mu$ Lに第一試薬240 $\mu$ Lを加え、37℃で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度III)。次いで第二試薬80 $\mu$ Lを加え、37℃で5分間加温後の吸光度を測定した(吸光度IV)。吸光度の測定は波長600nmで行い、試料の代わりに生理食塩水を用い同様に操作したもの(試薬ブランク)を対照とした。

各々の試料の吸光度III及び吸光度IVから、式Bを用いて各試料中のフルクトシルペプチド量に基づく吸光度変化量(吸光度V)を算出した。

$$\text{式B: 吸光度V} = \text{吸光度IV} - (\text{吸光度III} \times (20 + 240) / (20 + 240 + 80))$$

上記の吸光度IIIは、試料中の総ヘモグロビン濃度に比例するので、ヘモグロビンA1c値(%)既知の血球溶血液(ヘモグロビンA1c値として8.6%)を上記と同様に操作した場合の吸光度III及びVと比較し、各試料のヘモグロビンA1c値(%)を算出した。

実施例9～13及び比較例6により求めたヘモグロビンA1c値(%)を市販キット「ラビディアA1c」(富士レビオ社製)により測定した各試料のヘモグロビンA1c値(%) (参照例)とそれぞれ比較した。結果を表4に示した。

[0068] [表4]

試料 No.	実施例 9	実施例 10	実施例 11	実施例 12	実施例 13	比較例6	参照例
1	5.0	4.8	4.7	5.6	5.2	-165.6	5.6
2	3.9	4.4	5.0	3.8	4.3	-77.8	4.9
3	3.5	3.6	3.0	3.8	3.3	-94.8	4.6
4	5.2	5.5	5.7	4.6	5.1	-8.0	6
5	6.4	7.0	7.8	6.3	6.7	19.3	6.8
6	7.3	7.9	7.4	8.5	9.9	-10.7	7.9
7	7.9	8.3	8.2	9.1	9.6	-15.4	8.4
8	8.5	8.9	8.9	9.4	10.1	25.2	8.8
9	9.1	9.7	9.9	10.5	10.5	-1.0	9.6
10	10.8	11.1	12.3	12.0	11.7	30.0	11.5
相関係数	0.99	0.99	0.97	0.98	0.96	0.71	

相関係数以外の値は(%)

[0069] 表4から明らかなように、本発明に係る陰イオン系界面活性剤を含まない比較例6では、本来起こりえない負の値となってしまう場合があり、ヘモグロビンA1c値(%)の測定が全くできていなかった。これに対し本発明の基質の測定方法によって得られたヘモグロビンA1c値(%)は、参照例の結果と良好な相関性を示した。本発明の基質の測定方法により、ヘモグロビン含有試料中のヘモグロビンの干渉を回避して試料

中のヘモグロビンA1cと総ヘモグロビンを測定できることがわかった。

## 請求の範囲

- [1] 基質に対応するオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素をパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を用いて光学的に測定することにより試料中の基質を測定する方法において、ヘモグロビン含有試料をポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤で処理することを特徴とする、ヘモグロビン含有試料中の基質の測定方法。
- [2] 上記陰イオン系界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類又はアルキルスルホコハク酸類である請求項1記載の測定方法。
- [3] 試料中の基質が尿酸であって、オキシダーゼがウリカーゼである請求項1又は2記載の測定方法。
- [4] 試料中の基質がフルクトシルアミノ酸又はフルクトシルペプチドであって、オキシダーゼがフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ又はフルクトシルペプチドオキシダーゼである請求項1又は2記載の測定方法。
- [5] (A)ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸類、ポリオキシエチレンアルキルスルホコハク酸類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルスルホン酸塩類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸塩類から選ばれる陰イオン系界面活性剤、(B)基質に作用して過酸化水素を生成するオキシダーゼ、並びに(C)パーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を含むヘモグロビン含有試料中の基質測定用試薬。
- [6] 少なくとも、(1)界面活性剤、(2)糖化蛋白質に作用してフルクトシルペプチドを生成する蛋白質分解酵素及び(3)フルクトシルペプチドに作用して過酸化水素を産す

る酵素を含むことを特徴とする糖化蛋白質、糖化ペプチドもしくは糖化アミノ酸の濃度又はそれらの濃度比測定方法。

- [7] 界面活性剤が非イオン系界面活性剤及び／又は陰イオン系界面活性剤であって、ポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれることを特徴とする請求項6記載の糖化蛋白質、糖化ペプチドもしくは糖化アミノ酸の濃度又はそれらの濃度比測定方法。
- [8] リン酸エステルが、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸のモノエステル、ジエステル又はそれらの混合物である請求項7記載の方法。
- [9] 蛋白質分解酵素が糖化蛋白質又は糖化ペプチドに作用して生成するフルクトシルペプチドが、フルクトシルバリルヒスチジンである請求項6～8のいずれか1項記載の方法。
- [10] 蛋白質分解酵素が、バチルス属、アスペルギルス属、ストレプトマイシス属由来のもので、又はこれらの遺伝子組換えにより産生されるもので、単独又は複数で糖化蛋白質に作用させた時に、少なくともフルクトシルバリルヒスチジンを産することを特徴とする請求項6～9のいずれか1項記載の方法。
- [11] フルクトシルペプチドに作用して過酸化水素を産する酵素が少なくともフルクトシルバリルヒスチジンを基質とすることを特徴とする請求項6～10のいずれか1項記載の方法。
- [12] 糖化蛋白質がヘモグロビンA1cである請求項6～11のいずれか1項記載の方法。
- [13] 少なくとも界面活性剤で前処理されたヘモグロビンを含む試料中のヘモグロビン測定を行い、更にヘモグロビン測定用反応液にフルクトシルバリルヒスチジンを生成する蛋白質分解酵素を作用させ、ヘモグロビンA1c濃度測定を行うことを特徴とするヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定方法。
- [14] 血球を含む試料と界面活性剤を含む反応液を混合して血球からヘモグロビンを溶出させる工程、本反応液を希釈して光学的にヘモグロビンの濃度を求める工程、ヘモグロビンに蛋白質分解酵素を作用させて少なくともフルクトシルバリルヒスチジンを産する工程、少なくともフルクトシルバリルヒスチジンにこれを基質として過酸化水素



を産する酵素を作用させる工程、過酸化水素とパーオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を作用させる工程、呈色化合物の生成による吸光度変化を測定しヘモグロビンA1c濃度を求める工程、並びにヘモグロビン濃度とヘモグロビンA1c濃度からヘモグロビンA1c濃度比を求める工程からなるヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定方法。

- [15] 試料中の基質がフルクトシルバリルヒスチジン又は反応液に添加される試料由来以外の蛋白質分解酵素によりこれらを産する生体成分であって、過酸化水素を産する酵素がフルクトシルペプチドオキシダーゼである請求項14記載の方法。
- [16] ポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれる非イオン系界面活性剤及び／又は陰イオン系界面活性剤を用いることを特徴とするヘモグロビン濃度、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビンA1c濃度比の測定における試料の前処理方法。
- [17] 血球からヘモグロビンを溶出させる工程、ヘモグロビンの濃度を求める工程からなるヘモグロビン濃度測定において、少なくともポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの硫酸塩類、リン酸エステル類、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキルスルホコハク酸類及びアルキルフェニルエーテルスルホン酸類から選ばれる非イオン性界面活性剤及び／又は陰イオン系界面活性剤を用いることを特徴とするヘモグロビン濃度測定方法。
- [18] 生化学自動分析装置を用いてヘモグロビンA1c濃度比を測定する目的で、生化学自動分析装置の操作条件を設定する際に、(1)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の操作条件を個別に設定する、(2)ヘモグロビン濃度測定試薬をヘモグロビンA1c濃度測定用の構成試薬として共用できる、(3)ヘモグロビン濃度測定用とヘモグロビンA1c濃度測定用の試料を共用できる、(4)ヘモグロビン濃度測定とヘモグロビンA1c濃度測定の測定波長を同一にできることを特徴とする生化学自動分析装置を用いてヘモグロビンA1c濃度比を測定する方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017196

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, 1/37, G01N33/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, G01N33/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2001-204495 A (Asahi Kasei Corp.), 31 July, 2001 (31.07.01), (Family: none)	6, 7, 9-18 1-18
X Y	WO 2002/027331 A1 (Arkray, Inc.), 04 April, 2002 (04.04.02), & EP 1329722 A1 & US 2004/0063213 A1	6, 7, 9-18 1-18
X	JP 2001-095598 A (Kikkoman Corp.), 10 April, 2001 (10.04.01), & WO 2001/025475 A1 & EP 1223224 A1	6, 7, 9-18
X	WO 2002/006519 A1 (Arkray, Inc.), 24 January, 2002 (24.01.02), & EP 1304385 A1 & US 2003/0162242 A1	6, 7, 9-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 February, 2005 (01.02.05)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017196

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-508683 A (COULTER INT. CORP.), 27 July, 1999 (27.07.99), & WO 1997/001757 A1 & US 5786224 A	1-18
A	JP 01-112155 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 28 April, 1989 (28.04.89), & EP 0314046 A2 & US 4933277 A	1-18
A	JP 60-168050 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 31 August, 1985 (31.08.85), (Family: none)	1-18
A	JP 2000-342252 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 12 December, 2000 (12.12.00), (Family: none)	1-18
A	JP 2000-300394 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 31 October, 2000 (31.10.00), (Family: none)	1-18
A	JP 2001-057897 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 06 March, 2001 (06.03.01), (Family: none)	1-18

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/26, 1/37, G01N 33/72

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/00-70, G01N 33/72

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2001-204495 A (旭化成株式会社) 2001.07.31 (ファミリーなし)	6, 7, 9-18 1-18
X Y	WO 2002/027331 A1 (アークレイ株式会社) 2002.04.04 & EP 1329722 A1 & US 2004/0063213 A1	6, 7, 9-18 1-18
X	JP 2001-095598 A (キッコーマン株式会社) 2001.04.10 & WO 2001/025475 A1 & EP 1223224 A1	6, 7, 9-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.02.2005

国際調査報告の発送日

22.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2002/006519 A1 (アークレイ株式会社) 2002. 01. 24 & EP 1304385 A1 & US 2003/0162242 A1	6, 7, 9-18
A	JP 11-508683 A (COULTER INT CORP) 1999. 07. 27 & WO 1997/001757 A1 & US 5786224 A	1-18
A	JP 01-112155 A (第一化学薬品株式会社) 1989. 04. 28 & EP 0314046 A2 & US 4933277 A	1-18
A	JP 60-168050 A (和光純薬工業株式会社) 1985. 08. 31 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2000-342252 A (第一化学薬品株式会社) 2000. 12. 12 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2000-300394 A (第一化学薬品株式会社) 2000. 10. 31 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2001-057897 A (第一化学薬品株式会社) 2001. 03. 06 (ファミリーなし)	1-18